

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/050333

International filing date: 26 January 2005 (26.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 10 2004 004 654.9
Filing date: 29 January 2004 (29.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 February 2005 (28.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 10 2004 004 654.9

Anmeldetag: 29. Januar 2004

Anmelder/Inhaber: Siemens Aktiengesellschaft, 80333 München/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Messung der Konzentration oder Konzentrationsänderung einer redoxaktiven Substanz und zugehörige Vorrichtung

IPC: G 01 N 27/48

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 22. November 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Brosig

Beschreibung

Verfahren zur Messung der Konzentration oder Konzentrations-
 5 änderung einer redoxaktiven Substanz und zugehörige Vorrich-
 tung

Die Erfindung bezieht sich auf ein elektrochemisches Messver-
 fahren zur Messung der Konzentration oder Konzentrationsände-
 rung einer redoxaktiven Substanz. Daneben bezieht sich die
 10 Erfindung auch auf eine zugehörige Vorrichtung zur Durchfüh-
 rung des Messverfahrens mit einem elektrochemischen Transdu-
 cer-Array.

Amperometrische Sensoren basieren auf dem einfachen Prinzip,
 15 dass reduzierbare oder oxidierbare Substanzen durch Anlegen
 eines entsprechenden Potentials an einer Elektrode umgesetzt
 werden können. Der dabei fließende sogenannte Faraday'sche
 Strom ist ein Maß für die Konzentration dieser Substanz. Die-
 ser Strom kann jedoch nicht direkt nach Anlegen des Potenzi-
 20 als gemessen werden, da zunächst vor allem ein hoher kapazi-
 tiver Strom fließt. Dieser wird durch die Umladung der Dop-
 pelschicht der Elektrode verursacht. Er klingt exponentiell
 mit der Zeit ab.

Der Faraday'sche Strom verringert sich ebenfalls mit der
 Zeit, da durch den Umsatz von Substanz eine Verarmung vor der
 Elektrode statt findet. Die Nachlieferung von Substanz aus
 der Lösung zur Elektrode findet bei nicht gerührten, also
 nicht konvektiven Systemen, allein durch die Diffusion statt.
 30 Es stellen sich in der Lösung Konzentrationsprofile ein. Bei
 genügend positiven (Oxidation) bzw. negativen (Reduktion) Po-
 tentialen gilt für die Zeitabhängigkeit des Stromes die
 Cottrell-Gleichung.

$$I = nFA \frac{\sqrt{D}}{\sqrt{\pi t}} c_{\infty}, \quad s \rightarrow \infty \quad (1)$$

35 Dabei bedeuten:

n: Zahl der Elektronen pro Formelumsatz

F: Faraday-Konstante

A: Fläche der Elektrode

D: Diffusionskoeffizient

c_{∞} : Konzentration der umzusetzenden Substanz in der Lösung

5 s: Ausdehnung des Elektrolytraums vor der Elektrode

Gleichung (1) beinhaltet, dass der Faradaysche Strom mit der reziproken Quadratwurzel aus der Zeit abnimmt, also langsamer als der kapazitive Strom. Einige Zeit nach der Veränderung des Potentials wird der Strom daher hauptsächlich vom Faradayschen Strom bestimmt. Für jedes System gilt es, einen Zeitpunkt zu finden, bei dem der kapazitive Strom gering ist, der Faradaysche Strom jedoch noch möglichst hoch.

15 Eine Möglichkeit zur Bestimmung sehr kleiner Konzentrationen (10^{-10} mol/l) ist die voltammetrische Stripping-Analyse. Dabei wird durch Anlegen eines geeigneten Potentials die zu bestimmende Substanz zunächst an der der Elektrode angereichert. In einem zweiten Schritt wird dann die Substanzmenge auf der
20 Elektrode bestimmt [W. Buchberger, Elektrochemische Analyseverfahren, Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag 1998 und DE 44 24 355]. Dieses Verfahren ermöglicht auf Grund der zwei Verfahrensschritte keine zeitliche Auflösung. Konzentrationsänderungen können damit nicht oder nur sehr langsam verfolgt werden.

Ein weiteres analytisches Standardverfahren zur Bestimmung sehr kleiner Konzentrationen ist die Polarographie [Rach u. Seiler, Polarographie u. Voltametrie in der Spurenanalytik,
30 Heidelberg: Hüthig 1984]. Hier werden mit geeigneten Pulsverfahren und unter Verwendung einer sog. "Dropping Mercury Elektrode" (DME) Konzentrationen in der Größenordnung 10^{-9} mol/l messbar. Bei der DME macht man sich u.a. zunutze, dass jeder Quecksilbertropfen neu in die Lösung eintaucht und
35 dort wieder die Konzentration c_{∞} vorfindet. Bei einer statischen Elektrode ist dies jedoch nicht der Fall. Nach jeder Messung müsste man so lange warten bis das Konzentrationspro-

fil durch den Diffusionsprozess relaxiert ist. Je nach Größe des Diffusionskoeffizienten kann dieser Vorgang, wenn nicht gerührt wird, etliche Sekunden in Anspruch nehmen. Ist die Wartezeit nicht lang genug, so wird der Strom von Messung zu
5 Messung abnehmen, da die Anfangskonzentration vor der Elektrode sinkt.

Bei einigen Anwendungen kann es aber erforderlich sein in schneller Abfolge die Konzentration zu bestimmen, wenn zum
10 Beispiel eine Konzentrationsänderung beobachtet werden soll. Ein mögliches Einsatzgebiet ist die Verfolgung der enzymatischen Bildung eines Mediators in molekularbiologischen Detektionssystemen.

Bei biochemischen Sensoren werden molekulare Erkennungssysteme, z.B. Haptene, Antigene oder Antikörper, auf oder in der Nähe der Elektroden platzieren. Das Zielmolekül bindet daran und wird entweder direkt oder über Zwischenschritte mit einem Enzymlabel versehen. Wird nun das entsprechende Enzymsubstrat
20 zugegeben, setzt das Enzym eine Substanz frei, die detektiert werden kann. Dies geschieht entweder optisch oder elektrochemisch. Es handelt sich hier um den sogenannten ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Auf ähnlichem Weg lassen sich auch DNA-Analyseverfahren durchführen.

Bei der elektrochemischen Detektion ist es vorteilhaft nicht nur die absolute Konzentration der als "Mediators" bezeichneten Messgröße für die vorstehend angegebenen elektrochemischen Umsetzungen zu erfassen, sondern die Zunahme der Kon-
30 zentration während weniger Sekunden zu erfassen. Dadurch wird der Einfluss unterschiedlicher Zustände des biochemischen Systems zu Beginn der Messung eliminiert. Die zeitliche Auflösung einer solchen Messung muss dabei 1 bis 2 Hz betragen, um technisch und wirtschaftlich sinnvoll zu sein.

35 Speziell bei redoxaktiven Substanzen kann bisher unter Verwendung von Interdigitalelektroden das sogenannte Redoxcyc-

ling eingesetzt werden. Dabei wird ausgenutzt, dass die an einer Elektrode oxidierte Substanz an der zweiten Elektrode wieder reduziert werden kann. Die Elektroden werden dabei konstant auf das Oxidations- bzw. Reduktionspotenzial eingestellt. Dazu werden die beiden Interdigitalelektroden zusammen mit der Referenzelektrode und einer Gegenelektrode an einen Bipotentiostaten angeschlossen. [O.Niwa, M. Morita H. Tabei, Anal. Chem. 62 (1991), 447-452 und DE 4318519].

- 10 Eine Voraussetzung für das Redoxcycling ist, dass der Abstand zwischen den Elektroden in der Größenordnung der Diffusionsschichtdicke, also weniger μm , liegt. Auf Grund der Konzentrationsprofile geht in den gemessenen Strom neben der Konzentration und dem Diffusionskoeffizienten die Zahl der Elektrodenfinger und deren Länge ein [K. Aoki, J. Electroanal. Chem, 270 (1989), 35]. Daraus ergibt sich, dass die erforderlichen Strukturen sehr fein und aufwändig in der Herstellung sind.
- 15
- 20 Ein geeignetes Verfahren zur elektrochemischen Messung des Redoxcyclings mit einer praxisgerechten Elektrodenanordnung ist im Einzelnen in der WO 01/67587 A1 beschrieben.

- Aufgabe der Erfindung ist demgegenüber, ein Verfahren vorzuschlagen, bei dem die Bestimmung von Konzentrationen einer redoxaktiven Substanz in μM -Konzentrationen an preiswerten flächigen Elektroden möglich ist. Dabei soll das System nicht konvektiv sein, also weder Elektrode noch Lösung gerührt bzw. bewegt werden und die Messfrequenz $\geq 1 \text{ Hz}$ betragen. Daneben
- 30 soll eine zugehörige Messvorrichtung geschaffen werden.

- Die Aufgabe ist erfindungsgemäß bei einem Verfahren der eingangs genannten Art durch die Maßnahmen des Patentanspruches 1 gelöst. Eine zugehörige Messvorrichtung ist im Patentanspruch 11 angegeben. Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Verfahrens und der zugehörigen Messvorrichtung sind Gegenstand der abhängigen Ansprüche.
- 35

Grundlage der Erfindung ist die Erkenntnis, dass durch Verwendung einer neuen Variante des Redoxcyclings vorteilhafterweise an preisgünstigen Elektroden mit Durchmessern in der Größenordnung einiger 100 μm bis zu 1 cm gemessen werden kann. Komplex aufgebaute Interdigitalelektroden sind nicht mehr notwendig. Nunmehr können Transducer-Arrays verwendet werden, wie sie insbesondere in einer weiteren Anmeldung der Anmelderin mit gleicher Anmeldepriorität im Einzelnen beschrieben sind.

Bei der zugehörigen Messvorrichtung vereinfacht sich der Messaufbau gegenüber dem Redoxcycling dahingehend, dass kein Bipotentiostat benötigt wird. Ein einfacher Potentiostat in Kombination mit einem Pulsgenerator reicht aus.

Bei der Erfindung wird nicht - wie beim "normalen" Redoxcycling - ein stationärer Zustand eingestellt, sondern eine schnelle Relaxation des Konzentrationsgradienten elektrochemisch erzwungen. Dazu wird das Potenzial der Arbeitselektrode gepulst. Es bildet sich eine Diffusionsschicht aus, deren Dicke am Ende der Messperiode einen Maximalwert erreicht, der von der Länge der Messphase abhängt. Bei einer Messung von Oxidationsströmen wird während der Relaxationsphase ein hinreichendes Reduktionspotenzial eingestellt. Die während der Messphase oxidierten und noch vor der Elektrode befindlichen Spezies werden so wieder reduziert. Der Konzentrationsgradient und damit die Diffusionsschicht wird abgebaut. Statt also wie beim Redoxcycling konstante Diffusionsschichtdicken zu etablieren, wird beim erfindungsgemäßen gepulsten Redoxcycling die Diffusionsschicht zeitlich auf- und wieder abgebaut. In beiden Fällen wird dadurch eine zumindest in ihrem Maximalwert begrenzte Diffusionsschichtdicke eingestellt. Soll eine Reduktion beobachtet werden, so muss während der Messphase das Reduktionspotenzial und während der Relaxationsphase das entsprechende Oxidationspotenzial eingestellt werden.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Figurenbeschreibung von Ausführungsbeispielen anhand der Zeichnung in Verbindung mit den Patentan-
 5 sprüchen. Es zeigen

Figur 1 eine graphische Darstellung des gepulsten Redox-
 Cyclings,

10 Figur 2 eine graphische Darstellung der Abhängigkeit der relativen Konzentration vom Abstand der Elektroden,

Figur 3 eine graphische Darstellung des Stromes von der Konzentration und

Figur 4 eine graphische Darstellung der Steigung in Abhängigkeit vom Potenzial während der Relaxationsphase,

15 Figur 5 eine graphische Darstellung der Abhängigkeit der Stromdichte von der Zeit,

Figur 6 eine Darstellung entsprechend Figur 5 für die Relaxationsphase,

20 Figur 7 eine Darstellung entsprechend Figur 5 mit Vergleich von experimentellen und berechneten Werten,

Figur 8 eine graphische Darstellung der Abhängigkeit der Konzentration vom Elektrodenabstand

Figur 9 eine Messvorrichtung für das gepulste Redox-Cycling mit einem zugehörigen Transducer-Array,

Figur 10/11 das Transducer-Array für die Messvorrichtung gemäß Figur 9 in der Sicht von oben und unten, und

Figur 12 den Verlauf einer typischen Messung mit einer Messstromkurve.

30 In den Figuren 1 bis 4 wird zunächst die Methodik des gepulsten Redox-Cyclings beschrieben. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Methodik des Redox-Cyclings ans vom Stand der Technik bekannt ist. Anschließend sind an sich an den Figuren 5 bis 8 Betrachtungen zur Genauigkeit wiedergegeben und ist
 35 schließlich in Figur 9 eine Messvorrichtung mit einem exemplarische Transducer-Array, dessen Struktur in den Figuren 10 und 11 gezeigt ist, angegeben. Figur 12 gibt schließlich die

Verfahrensführung bei der Anwendung der Anordnung als DNA-Sensor wieder.

In Figur 1 sind die unterschiedlichen Phasen während der Messung gekennzeichnet. Welche die Mess- und welche die Relaxationsphase ist, hängt davon ab, ob ein Oxidations- oder Reduktionsstrom gemessen werden soll. Die Pulslängen für Oxidation und Reduktion müssen nicht gleich sein, d.h. die Zeiten Δt_{ox} und Δt_{red} können sich unterscheiden. Auch die Potenziale ϕ_{ox} und ϕ_{red} müssen nicht symmetrisch zum Redoxpotenzial ϕ_0 der Spezies sein.

Die Darstellung der Figur 1 zeigt den möglichen Potenzialverlauf unter Verwendung von Rechteckpulsen. Dabei sind die Potenziale ϕ_{ox} , ϕ_{red} und die Zeiten Δt_{ox} und Δt_{red} mit der Pulsform 11 in willkürlichen Einheiten aufgetragen. Die Pulsform 11 muss nicht symmetrisch sein. Es ist ebenso möglich das gepulste Redoxcycling mit Dreiecksspannungskurven oder Sinuskurven zu realisieren.

Geht man im Weiteren davon aus, dass die Konzentration eines in seiner reduzierten Form vorliegenden Moleküls gemessen werden soll. Dann ist während der Messphase das Potenzial positiv bezogen auf das Redoxpotenzial der Spezies. Die höchsten Messströme werden erreicht, wenn das Potenzial so weit im Positiven liegt, dass sich ein Diffusionsgrenzstrom einstellt. Der Strom ist dann nicht von der Kinetik der Redoxreaktion, sondern nur von der Diffusion begrenzt. Die zeitliche Entwicklung des Konzentrationsprofils der reduzierten Spezies ergibt sich aus der entsprechenden Lösung der Fickschen Gesetze für die Diffusion in den einfach unendlichen Halbraum.

$$c(t,x) = c_{\infty} \cdot \operatorname{erf}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right), \quad s \rightarrow \infty \quad (2)$$

Dabei bedeuten:

c: Konzentration als Funktion von Zeit und Ort

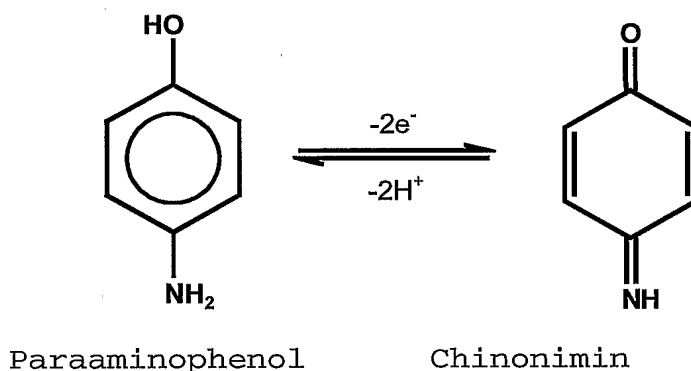
c_{∞} : Konzentration in der Lösung ($x \rightarrow \infty$)

erf: Fehlerfunktion

D: Diffusionskoeffizient

5 s: Ausdehnung des Elektrolytraums vor der Elektrode

In Figur 2 sind zwei Konzentrationsprofile 21 und 22 für eine Substanz mit dem Diffusionskoeffizienten $D = 3,6E-6 \text{ cm}^2/\text{s}$ gezeigt. Dies entspricht dem Diffusionskoeffizienten des Paraaminophenols (pAP), an dessen Beispiel die Funktionsweise des gepulsten Redoxcyclings im Weiteren demonstriert werden soll.



Nach 0,1 s hat die Diffusionsschicht eine Dicke von ca. 25 μm . Nach 0,25 s beträgt die Ausdehnung der an pAP verarmten Schicht schon 40 μm . Je dicker diese Schicht ist, desto länger dauert die Relaxation durch Diffusion.

Die Figur 3 zeigt die Stromdichte als Funktion der pAP-Konzentration in der Lösung für verschiedene Pulsfolgen, die durch Kennlinien 31 bis 34 gekennzeichnet sind. Die Messphase beträgt immer 0,25 s, die Relaxationsphase 0,75 s. Die Strommessung erfolgt 0,24 s nach Beginn der Messphase. Das Oxidationspotenzial während der Messphase beträgt bezogen auf das Redoxpotenzial +200 mV. Variiert wurde das Potenzial während der Relaxationsphase. Es nimmt Werte zwischen -300 mV und 0 mV bezogen auf das Redoxpotenzial ein. Im Einzelnen ist

$\phi_{\text{rad}}/\phi_{\text{ox}}$ bei Kennlinie 31 -300 mV/200 mV,
 bei Kennlinie 32 -200 mV/200 mV,

bei Kennlinie 33 -100 mV/200 mV
und bei Kennlinie 34 0 mV/200 mV.

Es ergeben sich bei diesen Parametern unterschiedliche Steigungen der Stromdichte 5 in ihrer funktionalen Abhängigkeit von der Konzentration pAP.

Die Steigung der Stromdichte mit der pAP-Konzentration, also die Empfindlichkeit der Messung, nimmt stetig mit negativer werdendem Potenzial während der Relaxationsphase zu. Eine
10 Auftragung der Steigung gegen das Relaxationspotenzial entsprechend Figur 4 zeigt mit der Kennlinie 41 deutlich die vorteilhafte Wirkung des gepulsten Redoxcyclings.

Während bei einem Relaxationspotenzial von 0 V vs. ϕ_0 die
15 Steigung nur 462 AcM/mol beträgt, erhöht sich dieser Wert auf 864 AcM/mol bei -300 mV vs. ϕ_0 . Diese Verdopplung beruht auf der verbesserten Wirkung des Redoxcyclings, weil bei einem Relaxationspotenzial von -300 mV vs. ϕ_0 das Chinonimin vor der Elektrode vollständig zu Paraaminophenol (pAP) reduziert
20 wird. Bei einem Relaxationspotenzial von 0 V vs. ϕ_0 wird hingegen gemäß der Nernstschen Gleichung direkt vor der Elektrode ein Konzentrationsverhältnis Paraaminophenol:Chinonimin = 1:1 eingestellt. Das Chinonimin wird also nur teilweise wieder reduziert.

Die Steigerung der Empfindlichkeit ist nur ein Vorteil des gepulsten Redoxcyclings. Die Konstanz des Stromsignals schon während der ersten Sekunden der Messung ist ein weiterer wesentlicher Vorteil.

30

Für die Bestimmung der Empfindlichkeit wurde die sich nach längerer Messzeit eingestellte Stromdichte eingesetzt. Bei der Messung von Enzymaktivitäten z.B. erfolgt die Messung aber so, dass die Lösung zunächst noch gerührt bzw. gepumpt
35 wird. Das vom Enzym gebildete pAP wird dadurch weggespült und es stellt sich ein konstanter Grundstrom ein. Dann wird die Pumpe gestoppt und die ansteigende Konzentration während der

ersten Sekunden gemessen. Typische Steigungen liegen dabei in der Größenordnung von $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2\text{s}$. Führt nun die Messung selbst zu einem Absinken des Signals, so überlagern sich beide Effekte und es wird eine zu geringe Steigung des Stromes und damit Enzymaktivität gemessen. Da dieses Absinken des Stromes durch den Verbrauch der Substanz außerdem von dessen Konzentration abhängt, lässt sich dieser Effekt nicht durch Normierungen eliminieren.

Experimente mit konstanter Konzentration geben Aufschluss über die zeitliche Signalkonstanz. Die Konzentration betrug $50 \mu\text{M}$ pAP, das Potenzial während der Messphase $+200 \text{ mV}$. Die Dauer der Messphase betrug 250 ms , wobei die Strommessung nach 240 ms erfolgte. Das Potenzial während der Relaxationsphase betrug im ersten Experiment 0 V vs. ϕ_0 , im zweiten -300 mV vs. ϕ_0 . Die Dauer der Relaxationsphase wurde zwischen 250 ms und $4,75 \text{ s}$ variiert.

In Figur 5 ist in einer graphischen Darstellung die Abhängigkeit der Stromdichte j von der Zeit wiedergegeben: Es ergeben sich Kennlinien 51 bis 54 für unterschiedliche Relaxationsphasendauern Δt_{red} , und zwar im Einzelnen zwischen $0,255$ und $4,755$. Die Ströme fallen innerhalb der ersten 10 s der Messung stark ab. Bei einer Länge der Relaxationsphase von $0,25 \text{ s}$ beträgt die Abnahme $14 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ in 10 s . Wird die Dauer der Relaxationsphase auf $4,75 \text{ s}$ erhöht, so erniedrigt sich die Abnahme des Signals auf $9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ in 10 s . Je kürzer also die Dauer der Relaxationsphase ist, desto stärker ist diese Abnahme des Signals mit der Zeit. Aber selbst bei langen Relaxationszeiten ist die Abnahme von $0,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2\text{s}$ noch erheblich verglichen mit den Steigungen, die in der Größenordnung $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2\text{s}$ in der Anwendung gemessen werden sollen.

Wird nun das Potenzial während der Relaxationsphase auf -300 mV herabgesetzt, verbessert sich die Signalkonstanz signifikant. Die ergibt sich insbesondere aus Figur 6, die eine Figur 5 entsprechende Darstellung mit Kennlinien 61 bis

64 für die gleichen Parameter der Relaxationsphasen Δt_{Red} zeigt:

Bei einer Relaxationszeit von 0,25s beträgt der Signalabfall
 5 noch $8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ in 10 s. Mit einer Relaxationszeit von 0,75 s
 beträgt dieser Wert noch $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ in 10 s, bei 1,75 noch
 $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ in 10 s und für 4,75 s nur noch $0,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ in 10 s.
 Schon bei einer Relaxationszeit von 0,75 s, also einer Mess-
 frequenz von 1 Hz, und einem Relaxationspotenzial von -300 mV
 10 beträgt der Signalabfall und damit auch der Fehler nur noch
 ca. 1 % vom erwarteten Messwert.

Die Experimente zeigen den Einfluss von Dauer und Potenzial
 der Relaxationsphase auf das Messsignal. Weiteren Aufschluss
 15 über die Wirkung des gepulsten Redoxcyclings können Simulati-
 onsrechnungen geben. Dabei wird zum einen die Stromdichte
 beim Redoxcycling berechnet zum anderen wird zum Vergleich
 die Stromdichte ohne Redoxcycling bestimmt.

20 Für die Simulationen mit Redoxcycling wurde angenommen, dass
 der Elektrolytraum eine Dicke von 100 μm hat. Sowohl Oxidati-
 ons- als auch Reduktionspotenzial sind so gewählt, dass die
 Reaktion im Diffusionsgrenzstrombereich abläuft, die Ströme
 also maximal sind. Die Pulslängen sind 250 ms beim Oxidati-
 onspotenzial und 750 ms beim Reduktionspotenzial. Bei den Be-
 rechnungen ohne Redoxcycling waren die Parameter gleich, bis
 auf die Tatsache, dass während der Relaxationsphase kein Po-
 tenzial vorgegeben wird und über den Potentiostaten kein
 Strom fließen kann. In dieser Zeit ist das System also elek-
 30 trochemisch entkoppelt.

Der Vergleich der Simulationsdaten erfolgt mit den experimen-
 tellen Ergebnissen für die entsprechenden Pulslängen und die
 Potenziale $\phi_{\text{ox}} = +200 \text{ mV}$ und $\phi_{\text{Red}} = -300 \text{ mV}$. Diese Potenzial-
 35 grenzen entsprechen am ehesten den Vorgaben für die Simulati-
 on. Die y-Achsenabschnitte der Simulationsdaten wurden den
 experimentellen Ergebnissen angepasst.

Die Figur 7 zeigt eine gute Übereinstimmung von Experiment und Simulation für das gepulste Redoxcycling, wobei 71 die gemessenen Werte und 72 die gerechneten Kennlinien darstellen. Der Abfall der Stromdichte ist unter diesen Bedingungen mit $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ in 4 s gering. Ohne Redoxcycling hingegen beträgt der Stromdichteabfall während der ersten 4 s schon $12 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, was durch die Kennlinie 73 verdeutlicht ist. Dazwischen liegen die Ergebnisse für ein gepulstes Redoxcycling mit Potentiostatierung während der Relaxationsphase beim Redoxpotenzial, was durch Kennlinie 74 wiedergegeben ist.

Die Verbesserung der Signalkonstanz um den Faktor 6 lässt sich direkt auf die Konzentrationsprofile zurückführen. Die folgende Abbildung zeigt die berechneten Konzentrationsprofile von pAP als Funktion des Abstandes von der Elektrode wie sie sich am Ende der 5. Relaxationsphase darstellen.

Beim gepulsten Redoxcycling wird während der Relaxationsphase das vorher gebildete Oxidationsprodukt wieder reduziert. In Folge ist die Konzentration an pAP direkt vor der Elektrode am Ende der Relaxationsphase wieder auf den ursprünglichen Wert c_∞ angestiegen. Weiter von der Elektrode entfernt ist die Konzentration nur leicht erniedrigt. Ohne Redoxcycling hingegen beträgt die Konzentration vor der Elektrode unmittelbar vor der nächsten Messphase nur noch 38 %. Auch weiter entfernt von der Elektrode ist die Konzentration deutlich abgesenkt.

Letzteres ergibt sich im Einzelnen aus Figur 8 mit Kennlinien 81 und 82: Dabei entspricht das Beispiel entsprechend Kennlinie 82 für eine Messung ohne Redoxcycling in der Praxis der Messung der Konzentration einer Substanz, die zwar oxidiert werden kann, deren Oxidationsprodukte aber nicht wieder reduzierbar sind. Analoges wäre auch der Fall bei einer Substanz, die reduziert, deren Reduktionsprodukte aber nicht wieder oxidiert werden könne. Im Fall eines biochemischen Sensors

könnte das z.B. Naphthol sein, das wie auch das pAP bei einer enzymatischen Reaktion freigesetzt werden kann.

Aus der Figur 9 ist die Messvorrichtung im Einzelnen ersichtlich: Außer durch ein Transducerarray 100, das anhand der Figuren 10 und 11 noch im Einzelnen beschrieben wird, wird die Messvorrichtung im Wesentlichen durch einen geeigneten Potentiostaten 5 in Kombination mit einem Pulsgenerator 6 realisiert, der optional Rechteck-, Dreieck- oder Sinuspulse liefert. Durch zwei Operationsverstärker 7 bzw. 7', von denen einer mit Groundpotenzial verbunden ist und einem definierten Messwiderstand 8 wird der Potentiostat 5 derart konzipiert, dass geeignete Potenziale bereitgestellt werden. Dabei können die Pulslänge, die Wiederholrate und die Höhe des Potenzials vorgegeben werden. Insbesondere die Pulslängen der Messphasen und die Relaxationsphasen können separat eingestellt werden und unterschiedlich lang sein. Auch die Potenziale können unterschiedlich groß sein.

Dem Transducerarray 100 sind einzelne Elektroden zugeordnet, die bestimmungsgemäß eine Referenzelektrode RE (= reference electrode), eine Gegenelektrode CE (= counter electrode) und wenigstens eine Messelektrode WE (= working electrode) realisieren. Diese Elektroden sind als Drei-Elektrodenanordnung mit dem Potentiostaten 5 verbunden. Das Signal des Potentiostaten 5 wird an eine in Figur 9 nicht im Einzelnen dargestellte Signalverarbeitungseinheit angeschlossen, mit welcher eine Auswertung unter Berücksichtigung obiger Ausführungen zur Messmethodik und Genauigkeit erfolgt. Im Allgemeinen ergibt sich der in Figur 9 als I_{out} dargestellte Signalverlauf zur Auswertung.

In den Figuren 10/11 ist das Transducerarray 100 als Teil der Messvorrichtung wiedergegeben, das planar und flexibel ist sowie insbesondere kostengünstig herzustellen ist. Wesentlich ist dabei, dass nunmehr für das gepulste Redoxcycling mit einem vereinfachten Transducer-Array 100 gemessen werden kann.

Die Figuren 10 und 11 zeigen die Ober- und Unterseite des Transducerarrays 100 - bestehend aus einem Metallsubstrat 1 und einer Isolatorschicht 2. Auf der Oberseite sind beispielsweise kreisförmige Vertiefungen 3_i , die als Kavitäten bezeichnet werden, dargestellt. Die Kavitäten 3_i entstehen durch die Strukturierung des Isolators 2. Auf dem Grund der Vertiefungen 3_i liegt die Oberseite des Metallsubstrats frei und bildet einen Messpunkt, sofern ein Analyt aufgebracht ist.

10

Die Darstellung der Rückseite zeigt durch Striche eine Strukturierung und damit eine Auftrennung des Metallsubstrats 1 in voneinander isolierte Teile. Jede Metallinsel korrespondiert mit einer Vertiefung 3_i auf der Vorderseite. Durch Punkte sind die möglichen Kontaktstellen für eine sog. Nadelkarte zur vereinfachten elektrischen Kontaktierung der Metallflächen angedeutet. Wesentlich ist dabei, dass mehrere Metallinseln, vorzugsweise drei, mit einem Analyten einen Sensor definieren und mit den zugehörigen Elektroden 15, d.h. eine Messelektrode WE, eine Gegenelektrode GE und eine Referenzelektrode RE zur Durchführung von elektrochemischen Messungen geeignet sind.

20

Weitere spezifische Elektrodenanordnungen sind in einer parallelen Anmeldung der Anmelderin mit gleicher Anmeldepriorität und der Bezeichnung "Elektrochemisches Transducer-Array und dessen Verwendung" beschrieben.

30

Mit einer Anordnung gemäß Figur 9 und einem Transducer-Array 100 gemäß Figur 10/11 wird beispielhaft ein biochemischer Sensor zur DNA-Analyse realisiert: Es wird das anhand der Figuren 10/11 beschriebene Transducer-Array 100 aus einer Metallschicht und einer damit verbundenen Isolatorschicht mit Kavitäten 3_i eingesetzt. Der Durchmesser der Kavitäten 3_i beträgt 0,8 mm, die Tiefe 90 μ m und der Abstand zwischen zwei

35

benachbarten Elektroden 1mm. Die Elektrodenoberflächen sind mit einer 2,3 μm dicken Goldschicht bedeckt.

Insgesamt besteht für diesen Anwendungszweck die Sensoranordnung aus vier Elektroden. Eine der Elektroden ist als Referenzelektrode mit einer Silber/Silberchlorid(Ag/AgCl)-Schicht belegt, eine andere Elektrode wird als Gegenelektrode CE verwendet und die zwei weiteren Elektroden dienen als Messelektroden WE.

Auf einer der Messelektroden wird eine synthetische Oligonukleotidsequenz der Länge 25 mittels einer endständigen Thiolgruppe an der Goldoberfläche als Positivprobe verankert.

Die zweite Messelektrode bleibt als Negativprobe frei. Dann wurden beide Oberflächen mit einer Lösung von 1 mg Rinderse-
rumalbumin pro ml 15 Minuten inkubiert und anschließend das Sensorarray in einen 100 μm tiefen Durchflusskanal eingesetzt. Zunächst werden 10 μl einer 10 μM biotinilierten Zielsequenz innerhalb von ca. 5 Minuten über die Elektroden gepumpt. Dann wird nach einem Waschschrift eine Lösung von

Streptavidin markierter alkalischer Phosphatase darüber gegeben. Das Waschen erfolgt mit einer Pufferlösung von 100 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan titriert auf pH 8 mit Salzsäure, 130 mM NaCl. Nach abermaligem Waschen wird eine 2 mM Lösung des Enzymsubstrats Paraaminophenylphosphat (pAPP) in der Pufferlösung über das Sensorarray gepumpt. Bei Anwesenheit des Enzyms alkalische Phosphatase wird das Enzymsubstrat pAPP zu Paraaminophenol (pAP) umgesetzt.

Referenzelektrode RE, Gegenelektrode CE und jeweils eine der beiden Messelektroden WE sind jeweils in einer Dreielektrodenanordnung an einen Potentiostaten angeschlossen. Die Messung erfolgt mittels gepulstem Redoxcycling. Während der Messphase wird das vom Enzym gebildete Paraaminophenol zu Chinonimin oxidiert. Das Oxidationspotenzial ϕ_{ox} beträgt +200 mV vs. ϕ^0 . In der Relaxationsphase wird das gebildete Chinonimin wieder zu Paraaminophenol reduziert bei $\phi_{\text{Red}} = -200$ mV. Die Pulslänge der Messphase beträgt 250 ms, die der

Relaxationsphase 750 ms. Die Strommessung erfolgt 240 ms nach Beginn der Messphase.

Zu Beginn des Experiments ist die Positivprobe, also die
5 Elektrode mit der Fängersequenz angeschlossen. Die Lösung mit dem Enzymsubstrat fließt - durch eine Pumpe gefördert - zunächst über die Negativprobe und dann über die Positivprobe. Durch die Fließbewegung wird von dem Enzym gebildetes pAP von den Elektroden weggespült, so dass bei eingeschalteter Pumpe
10 der Strom konstant und gering ist. Wird nun die Pumpe gestoppt steigt die pAP-Konzentration durch die Enzymaktivität mit der Zeit an. In der Messung zeigt sich dies durch einen starken Anstieg des Stromsignals mit 20 nA/s. Wird die Pumpe wieder eingeschaltet, so sinkt das Signal wieder auf den ursprünglichen Wert. Dieser Vorgang kann beliebig oft wiederholt werden.
15

Die Figur 12 zeigt den zeitlichen Stromverlauf bei Pumpe "on"/"stopp" an der beschriebenen Sensoranordnung mit positiver und negativer Probe: Die Kennlinie 121 zeigt den Verlauf des Pumpenstroms. Es ergibt sich für das Experiment ein spezifischer Verlauf mit einzelnen Peaks, wobei Parameter die Aktivierung der Pumpe einerseits ("stopp"/"on") und das Umschalten der Messelektroden andererseits ist. Der interessierende Messbereich ist jeweils strichliert unterlegt. Bei $t = 400$ s wurde auf die Negativprobe umgeschaltet. Hier sinkt der Strom beim Stoppen der Pumpe zunächst, bleibt dann kurze Zeit konstant und steigt dann langsam an. Dieser Anstieg wird durch die Diffusion von pAP von der positiven zur negativen
20 Probe hin verursacht. Bei Pumpe "on" kommt ein Peakstrom hinzu, da der Elektrolyt zunächst von der positiven zur negativen Probe fließt und damit eine erhöhte pAP-Konzentration zur benachbarten Elektrode transportiert. Insgesamt ist die Diskriminierung von positiver und negativer Probe sehr gut.
30

35

Patentansprüche

1. Verfahren zur Messung der Konzentration oder Konzentrationsänderung einer redoxaktiven Substanz bei dem durch Anlegen geeigneter Potenziale an einer Arbeitselektrode ein Reduktionsvorgang oder ein Oxidationsvorgang bewirkt wird, dadurch gekennzeichnet, dass das Potenzial der Arbeitselektrode gepulst wird und somit eine schnelle Relaxation des Konzentrationsgradienten elektrochemisch erzwungen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass bei Messung von Oxidationsströmen während der Relaxationsphase ein hinreichendes Reduktionspotenzial eingestellt wird und die während der Messphase oxidierten und noch vor der Elektrode befindlichen Spezies wieder reduziert werden (sogenanntes gepulstes Redoxcycling).
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass bei einer Messung von Reduktionsströmen während der Relaxationsphase ein hinreichendes Oxidationspotenzial eingestellt wird und die während der Messphase reduzierten und noch vor der Elektrode befindlichen Spezies wieder oxidiert werden (sogenanntes gepulstes Redoxcycling).
4. Verfahren nach Anspruch 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Wiederholrate für das gepulste Redoxcycling wenigstens 1/10 Hz beträgt.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das gepulste Redoxcycling mit vorgebbaren Impulsformen, vorzugsweise mit einem Rechteck-, Dreieck- oder Sinus-Verlauf, durchgeführt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Messphasen-Pulslängen so gewählt werden, dass gegen Ende des Pulses der kapazitive Strom klein gegenüber dem Faraday'schen Strom ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Relaxationsphase wenigstens so lang ist wie die Messphase.

5

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass bei einer Wiederholrate von 1 Hz die Pulslängen der Messphasen 100 bis 300 ms, vorzugsweise 250 ms, und die Relaxationsphase zwischen 900 und 700 ms, vorzugsweise 750 ms, beträgt.

10

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Potenziale derart gewählt werden, dass die Reaktionen im Diffusionsgrenzstrombereich ablaufen.

15

10. Vorrichtung zur Durchführung des Messverfahrens nach Anspruch 1 oder einem der Ansprüche 2 bis 9, mit einer Einrichtung zum Erzeugen von zeitlich vorgebbaren und veränderbaren elektrischen Potenzialen und mit einem Transducer-Array

20

(100), bei dem wenigstens ein flexibles, planares Metallsubstrat (1) vorhanden ist, auf dem mindestens ein flexibler Isolator (2) mit fester Verbindung von Metalloberfläche und Isolatoroberfläche angeordnet ist, wobei das Metallsubstrat derart strukturiert ist, dass elektrisch gegeneinander isolierte Metallbereiche (10_i) vorliegen und wobei der auf dem Metallsubstrat (1) befindliche Isolator (2) derart strukturiert ist, dass Kavitäten (3_i) mit offenen Metalloberflächen (101_i) im Isolator (2) definiert sind.

30

11. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Einrichtung zum Erzeugen von vorgebbaren elektrischen Potenzialen ein Potentiostat (5) ist.

35

12. Vorrichtung nach Anspruch 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, dass dem Potentiostaten (5) zum Erzeugen von gepulsten elektrischen Potenzialen ein Pulsgenerator (6) zugeordnet ist.

13. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass im Potentiostaten (5) Operationsverstärker (7, 7') und ein definierter Messwiderstand (8) vorhanden sind.

Zusammenfassung:

Verfahren zur Messung der Konzentration oder Konzentrations-
änderung einer redoxaktiven Substanz und zugehörige Vorrich-
5 tung

Zur Verfolgung der Konzentrationsänderung einer redoxaktiven
Substanz werden geeignete Potenziale an einer Arbeitselektro-
de für einen Reduktionsvorgang oder einen Oxidationsvorgang
10 angelegt. Gemäß der Erfindung wird das Potenzial der Arbeits-
elektrode gepulst und wird somit eine schnelle Relaxation des
Konzentrationsgradienten elektrochemisch erzwungen. Dabei
kann an einfachen Transducer-Arrays gemessen werden. Bei ei-
ner Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens ist neben ei-
15 nem geeigneten Potentiostaten ein Transducer-Array mit einem
planaren Metallsubstrat (1) vorhanden, auf dem mindestens ein
flexibler Isolator (2) mit fester Verbindung von Metallober-
fläche und Isolatoroberfläche angeordnet ist, wobei das Array
durch geeignete Strukturierung erzeugt wird.

20
FIG 9

FIG 1

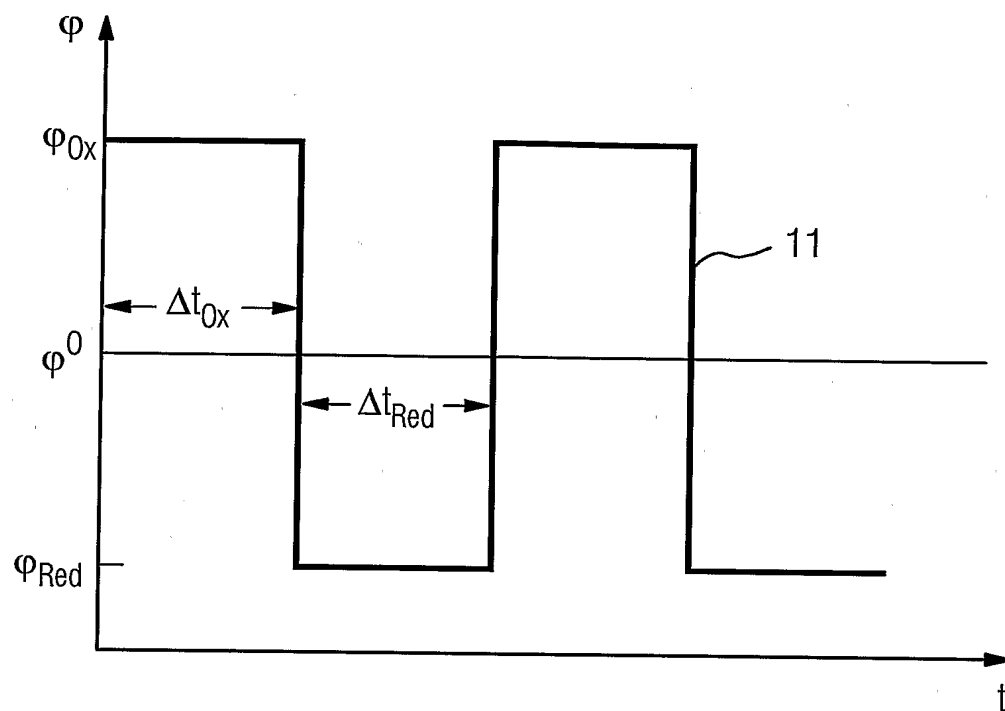


FIG 2

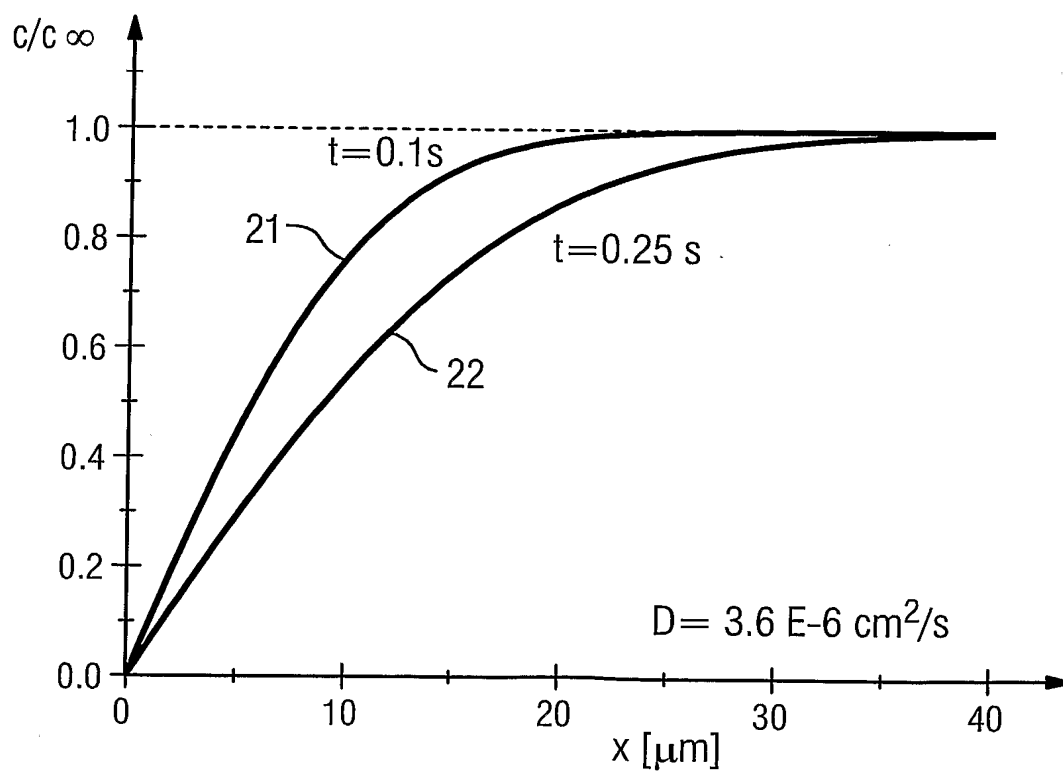


FIG 3

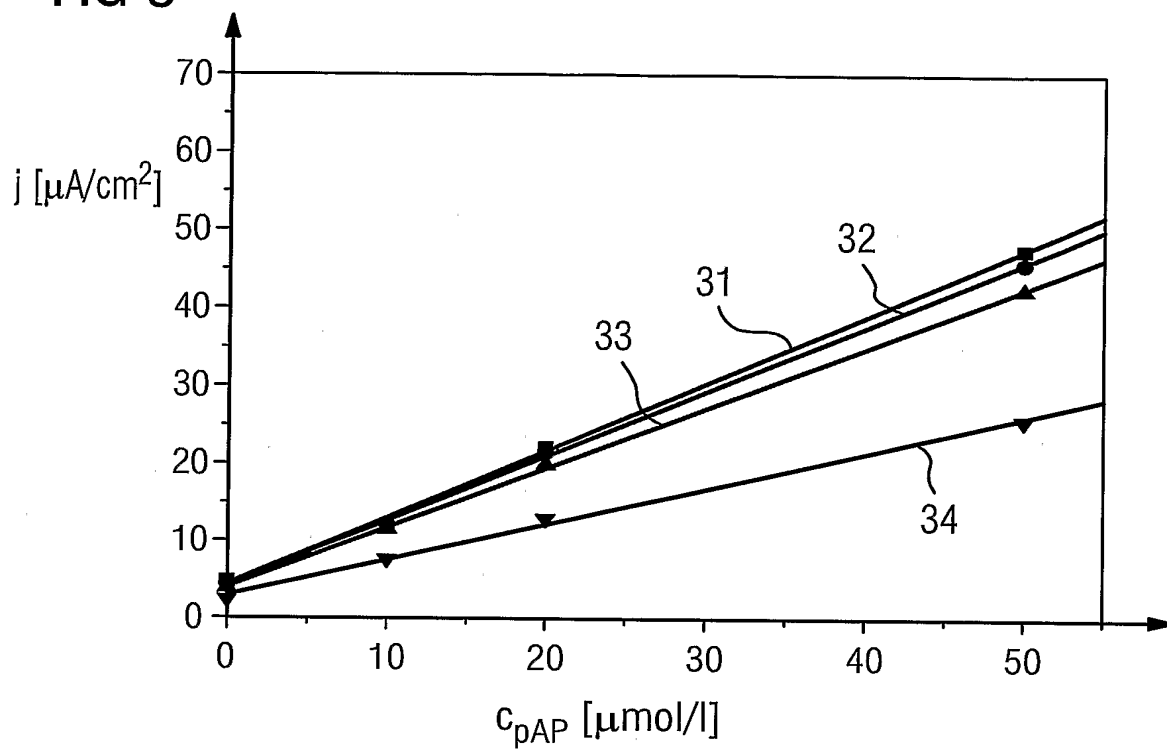


FIG 4

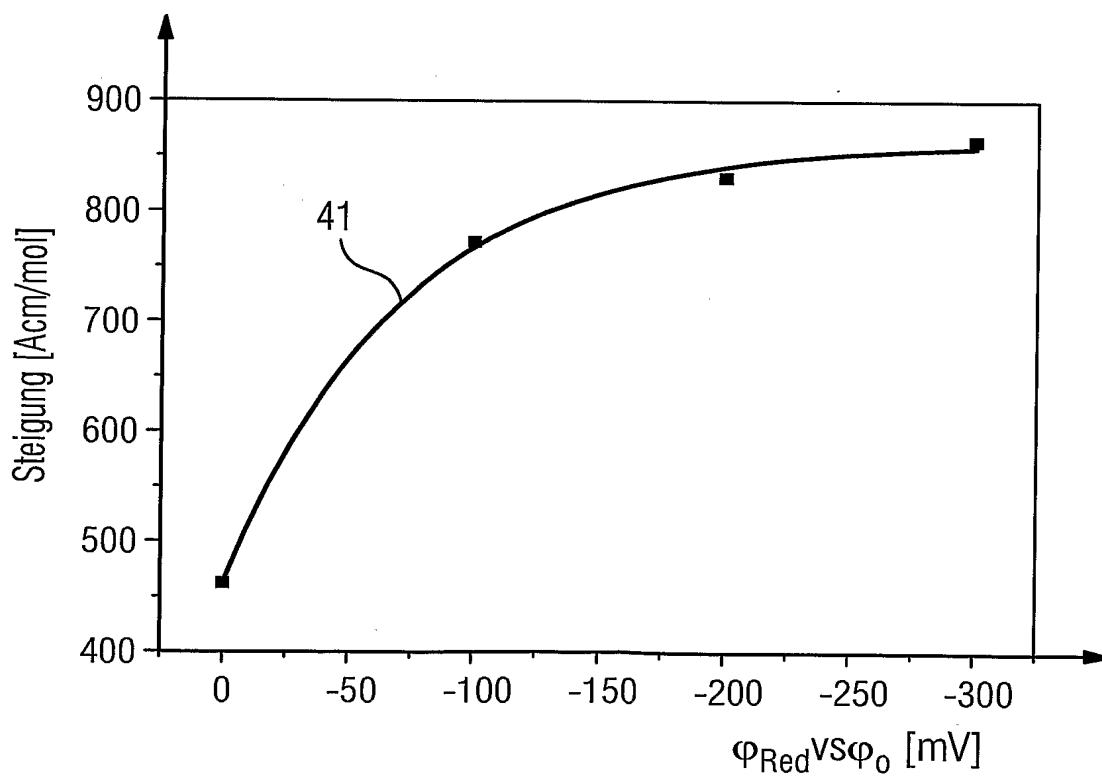


FIG 5

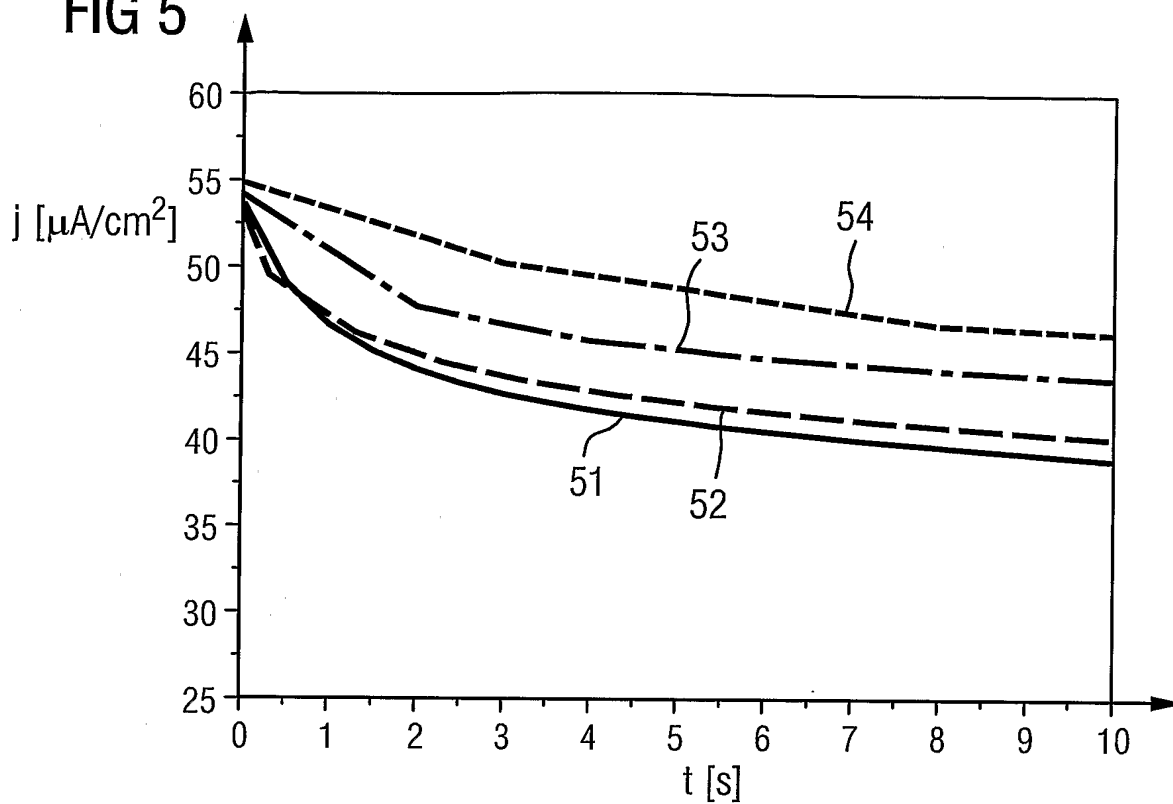


FIG 6

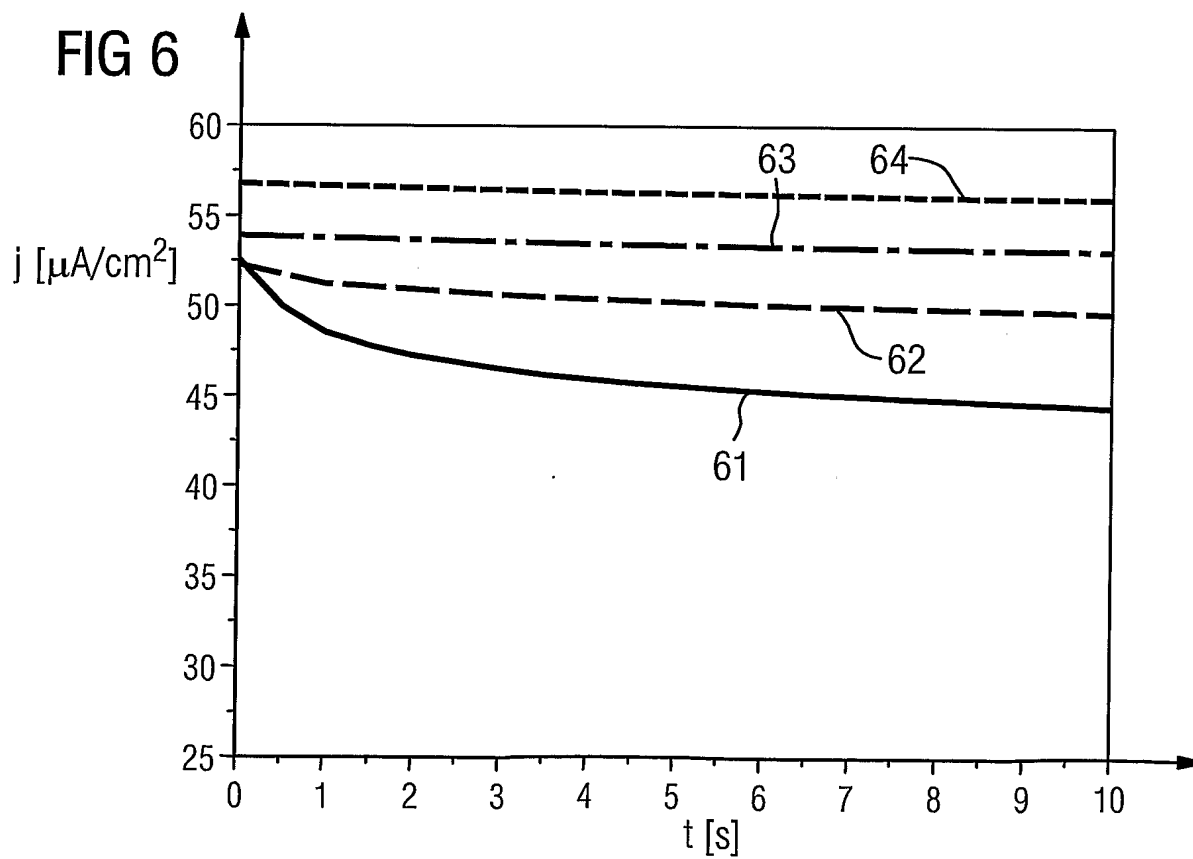


FIG 7

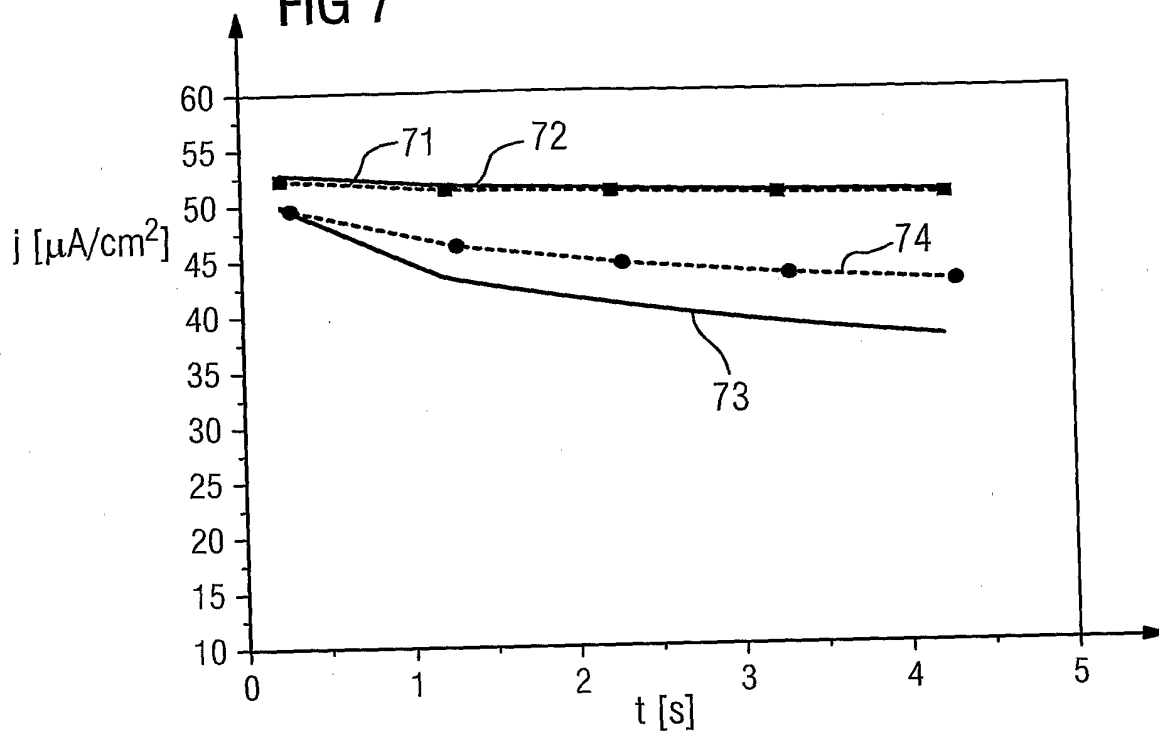


FIG 8

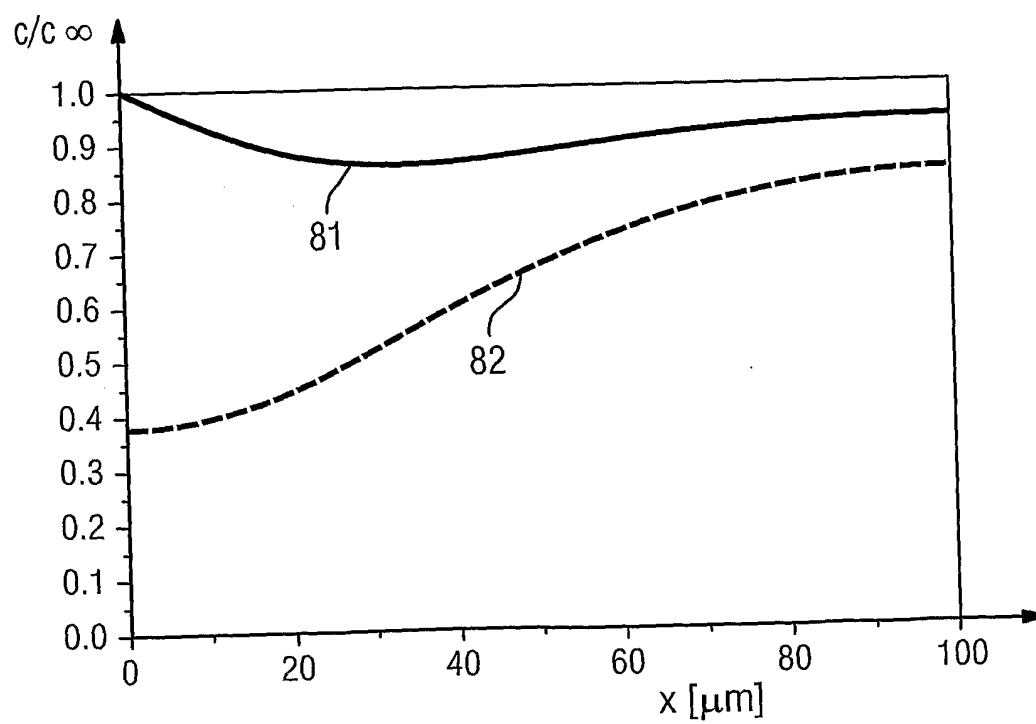


FIG 9

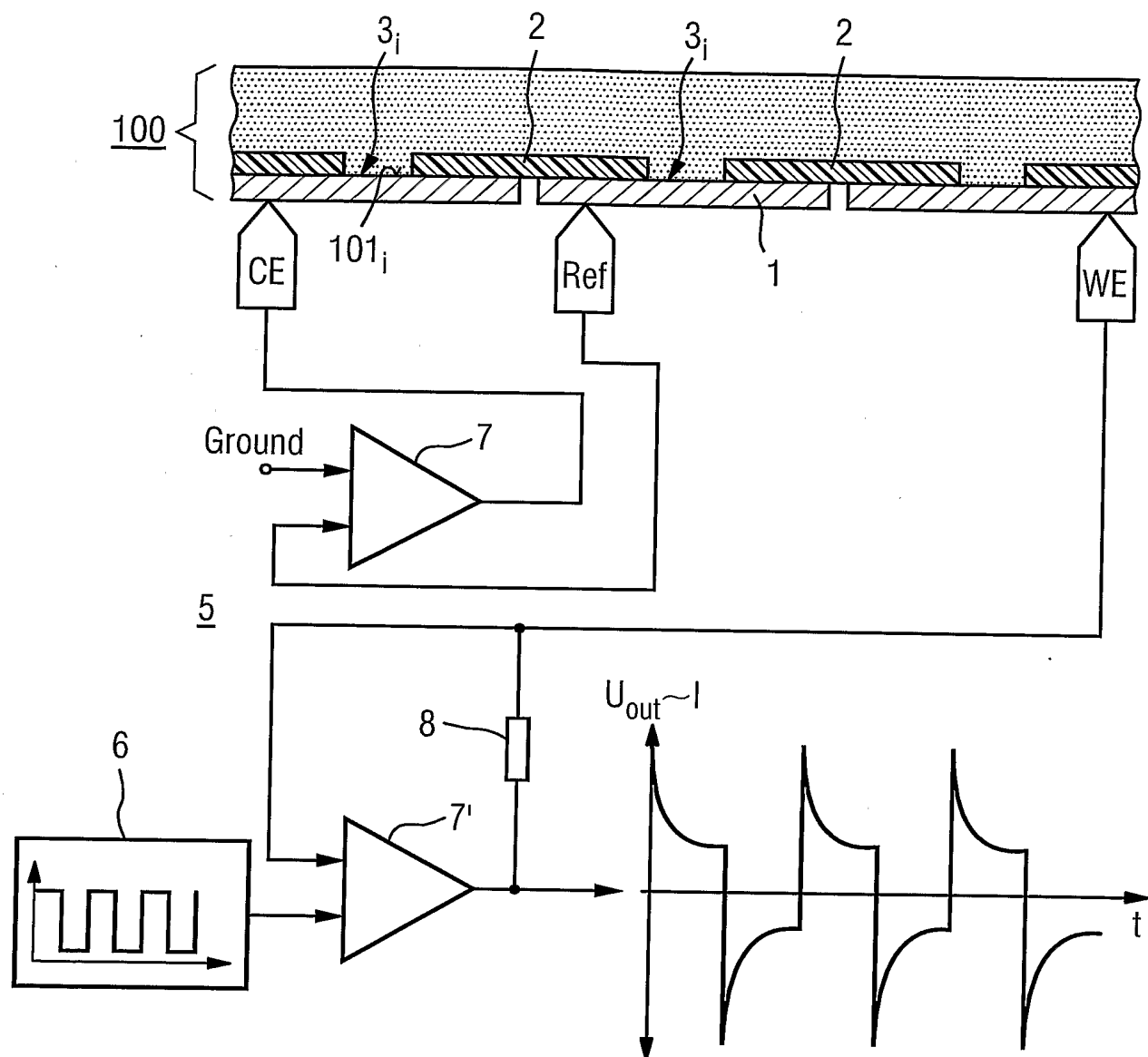


FIG 10

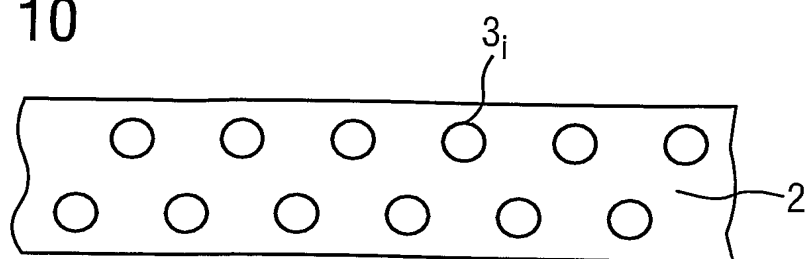


FIG 11

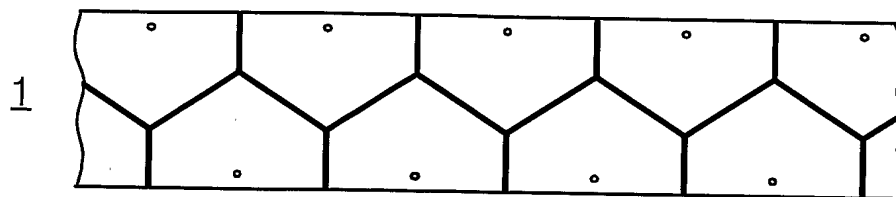


FIG 12

